

VIZSGÁLATOK BELSŐ STANDARDNAK ALKALMAS FEHÉRJÉK IZOELEKTROMOS PONTJÁNAK MEGHATÁROZÁSÁRA

TÖRÖK ATTILÁNÉ DR. PUSZTAY ÉVA*

Az izoelektromos fókuszálással történő izoelektromos pont meghatározásának egyik alapvető feltétele lineáris pH-gradiens létrehozása.

Számos kísérleti adat szerint azonban az izoelektromos fókuszálásnál kialakuló pH-gradiens nem szigorúan lineáris. Ennek oka lehet az alkalmazott hordozó amfolit nem-lineáris összetétele komponenseinek izoelektromos pontjait tekintve, valamint a gél-technikánál fellépő elektroosmotikus jelenségek. Ezért néhány kutató felvetette a „pH-jelzők” alkalmazásának gondolatát (1), amelyeket másképpen belső standardoknak is neveznek.

Belső standardként olyan nagy molekulájú amfoter vegyületek alkalmazhatók, amelyek kellő tisztaságban kaphatók a kereskedelembe, vagy könnyen előállíthatók, és izoelektromos pontjukat pontosan meghatározták. A belső standardokat a vizsgálandó fehérjékkel egyidejűleg fókuszálva, ismert izoelektromos pontjaik révén lehetővé válik a pH-gradiens korrekciója, ezenkívül viszonyítási pontként szolgálnak fehérjék ismeretlen izoelektromos pontjának meghatározásánál. Egyes szerzők fémkomplexeiket (2), mások amfoter színezékeket (3) javasoltak pH-jelzőkként történő alkalmazásra. Ez ideig csak néhány közlemény foglalkozott fehérje típusú standardok alkalmazási lehetőségével (4,5).

A felhasznált fehérjék sora azonban további bővítésre szorul, főleg abból a szempontból, hogy a standardok izoelektromos pontjai az egész alkalmazott pH tartományra kiterjedjenek. Ezek az értékek ugyanis a kísérleti feltételek szigorú betartása mellett olyan vonatkozási alapot nyújthatnának a pH gradiens megállapításához, amely kiküszöbölhetővé tenné a pH mérését. Ehhez azonban jelenleg még nem áll elegendő kísérleti adat a szakirodalom rendelkezésére.

1. *Anyagok, módszerek:*

A fenti szempontok figyelembevételével a következő fehérje mintákat vizsgáltuk:**

ovalalbumin	(Netherlands Inst. for Dairy Res.)
β -laktoglobulin	(Netherlands Inst. for Dairy Res.)
myogloblin (ló)	(Koch Light Lab. England)
ferritin	(Serva, Heidelberg)

* Kémia Tanszék

** A vizsgálatok a Holland Tejipari Kutatóintézetben (Netherlands Institute for Dairy Research) történtek.

conalbumin	(Serva, Heidelberg)
citochrom-c	(Boehringer, Mannheim)
ribonuclease	(Worthington Biochem. Corp.)
albumin (human)	(Netherlands Red Cross Lab.)
insulin	(Organon, The Netherlands)

Az izoelektromos pont meghatározásokat 2% hordozó amfolitot tartalmazó 5%-os vékonyrétegű poliakrilamid gélben végeztük, Bours szerint (6), az alábbi törzsoldatok felhasználásával.

A oldat: 1 ml N,N,N',N'-tetrametil-1,2-diaminoetán deszt. vízzel 150 ml-re kiegészítve.

B oldat: 100 g akrilamid és 2,7 g N,N'-metilénbiszakrilamid deszt. vízzel 400 ml-re kiegészítve.

C oldat (fotoaktivátor): 2 mg riboflavin 100 ml deszt. vízben oldva.

Hordozó amfolit: különböző pH tartományú, 40%-os „Ampholine” oldat (LKB-Produkter, A. B., Bromma, Sweden).

A gél-lap elkészítéséhez fenti törzsoldatokból a következő mennyiségeket alkalmaztunk: 7,5 ml *A* oldatot, 15 ml *B* oldatot, 3,5 ml „Ampholine”-t és 24,0 ml deszt. vizet összekevertünk, majd legvégül fényről védve 20,0 ml *C* oldatot adtunk hozzá.

A polimerizációt direkt napfény, ill. U.V. lámpa segítségével végeztük. Az alábbi pH tartományú lapokat készítettük:

pH 3—7 (3—7 pH tartományú Ampholine-ből),

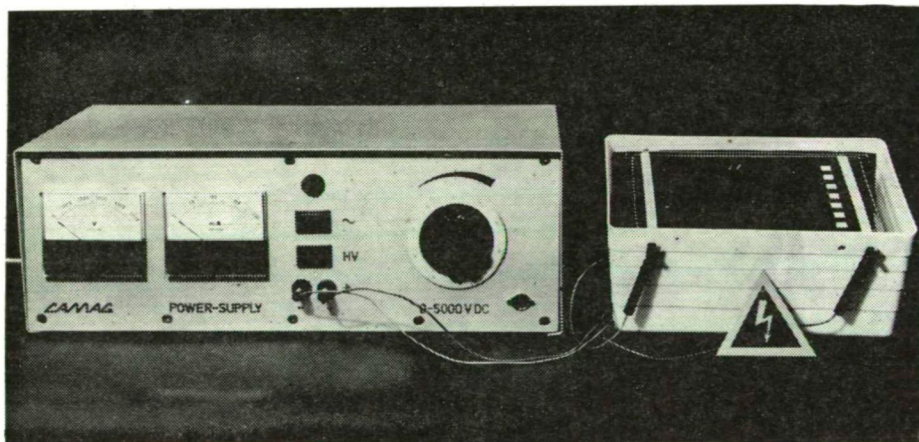
pH 3—10 (3—10 pH tartományú Ampholine-ből),

pH 3—7 (3—5 és 5—7 pH tartományú Ampholine-ből összeállítva),

pH 3—10 (3—5, 5—7 és 7—10 pH tartományú Ampholine-ből összeállítva),

pH 5—10 (5—7 és 7—10 pH tartományú Ampholine-ből összeállítva).

Gél-lapot készítettünk a fenti eljárástól eltérő módon úgy is, hogy a polimerizációt Ampholine inkorporálása nélkül hajtottuk végre, majd a kész lapot 37 °C-on 20 órán át száradni hagytuk, és ezt követően 2%-os Ampholine oldattal equilibráltuk



1. ábra

Vékonyrétegű izoelektromos fókuszáláshoz összeállított berendezés. A gélréteget hordozó üveglap gélréteggel lefelé helyezkedik el a doboz két oldala közé rögzített szénelektrodokon. A fehérje minták felvitelére szolgáló szűrőpapír kockák az anódos oldalon vannak.

6 órán át. (Az eredmények közlésénél az equ. (=equilibrált) ill. inc. (=inkorporált) jelölés a polimerizáció módjára utal.)

A fehérje -minták 1%-os oldatából 10–20 μ l-t alkalmaztunk, közvetlenül a géltre helyezett 10 \times 10 mm-es Whatman 3 MM szűrőpapír kockákon. Az elektródoknak megfelelő helyen a szűrőpapír-csíkokat a katódos oldalnál 5%-os etilén-diaminnal, az anódos oldalnál 5%-os foszforsavval nedvesítettük meg. Az izoelektromos fókuszálást grafit elektródok között, 18 cm-es elektródtávolsággal 20 mA kezdeti áramerősséggel végeztük, 4 °C-os térben. Az alkalmazott berendezést az 1. ábra mutatja. A fókuszálási idő 16 óra volt. A pH gradiens meghatározását azonnal a fókuszálás befejezése után végeztük, közvetlenül a gél felszínén, lapos üvegmembránnal ellátott kombinált elektródával (Ingold A G typ LOT 403–30–M8), 4° C-on.

A fehérje sávokat Coomassie Brilliant Blue R-250 0,05%-os oldatával festettük meg.

2. Eredmények

A kapott eredményeket az I. táblázat foglalja össze:

1. TÁBLÁZAT

Vékonyrétegű poliakrilamid gélben izoelektromos fókuszálással meghatározott izoelektromos pont értékek

Fehérje	pH tartomány	Az elválasztott sávok izoelektromos pontjai 4 °C-on (átlagértékek)	
Ovalbumin A_1 és A_2	3–10 (equ.)	4,65	4,73
	3–10 (inc.)	4,64	4,71
	3–7 (inc.)	4,61	4,69
β -laktoglobulin A B	3–10 (equ.)	5,31	5,40
	3–10 (inc.)	5,30	5,42
	3–7 (inc.)	5,33	5,42
Myoglobin	3–10 (equ.)	7,15	7,65
	3–10 (inc.)	7,15	7,65
	5–10 (equ.)	7,15	7,63
Ferritin	3–10 (inc.)	4,08	
	3–7 (inc.)	4,05	
Conalbumin	3–10 (inc.)	5,97	6,02
	3–7 (inc.)	5,86	6,00
Ribonuclease	3–10 (inc.)	8,96	
Albumin	3–10 (inc.)	4,95	
	3–7 (inc.)	4,93	
Cytochrom-c	3–10 (inc.)	9,48	
Insulin	3–7 (inc.)	5,95	

3. Az eredmények értékelése

A kísérletek során szerzett tapasztalatok, valamint a közölt adatok alapján az alábbi következtetések állapíthatók meg:

Az Ampholine-oldat inkorporálásával, ill. equilibrálásával készített rétegek egyaránt reprodukálható eredményeket szolgáltatnak. Utóbbi esetben megtakarítás érhető el a költséges és nehezen beszerezhető Ampholine-oldat tekintetében, ugyanakkor a réteggészítés időtartama jelentősen megnőtt.

A pH gradiens linearitása szempontjából jobb eredmény érhető el, ha a kívánt pH tartományt különböző, kisebb pH tartományú Ampholine törzsoldatokból állítjuk össze (pl. a 3–10 pH tartományú Ampholine-oldat helyett 1 rész pH 3–5, 1 rész pH 5–7 és 1 rész pH 7–10 Ampholine törzsoldatokból készített kompozíciót alkalmazunk).

A citochrom-c izoelektromos pontjának megmérésekor 0,1% arginint adtunk a gélhez polimerizálás előtt Radola (4) javaslata szerint, a pH gradiens lúgos oldat felől történő stabilizálása végett. Ennek hiányában a minta a katódig vándorol, mivel a tényleges pH tartomány általában 3,8-tól 9,2-ig terjed a névleges 3–10 helyett.

Az insulin izoelektromos fókuszálásakor a triklórecetsavval történő mosás után a minta fehér zóna formájában válik ki a rétegben, amely az oldószerelleggyel történő kezelés után kioldódik. Ezért az insulin mintát tartalmazó réteg kiértékelését festés nélkül, közvetlenül a triklórecetsavas mosás után végeztük, a jól látható fehér zóna helye alapján.

A vizsgált fehérjék közül az insulin és a citochrom-c nem alkalmas belső standardként történő alkalmazásra, mivel a szokásostól eltérő kezelést igényelnek, míg a további minták a leírt kísérleti körülmények között belső standardként alkalmazhatók. Az albumin és a conalbumin mintákból a többihez viszonyítva kevesebbet kell alkalmazni (1%-os oldatból 10 μ l-t), különben széles diffúz zónát adnak.

Az izoelektromos pontok reprodukálhatóságának szempontjából, mint erre már néhány szerző rámutatott (5, 7), igen fontos körülmény az alacsony hőmérsékleten történő izoelektromos fókuszálás, valamint a fókuszálással azonos hőmérsékleten történő pH mérés. A szobahőmérsékleten, ill. 4 °C-on mért izoelektromos pontok 0,1–0,3 pH egység eltérést mutatnak, az alacsonyabb hőmérséklet eredményezi a magasabb értéket. Mivel munkánk során mind az elválasztást, mind a pH mérést 4 °C-on végeztük, a kapott izoelektromos pontok azon irodalmi adatokkal mutatnak ó egyezést, amelyeket szintén 4 °C-on határoztak meg (5,8).

Az ismertetett fehérjék izoelektromos pontjai 4,05-től 8,96-ig terjedő értékeket szolgáltatnak; így a leggyakrabban alkalmazott pH tartományban újabb viszonyítási pontokat nyújtanak a pH gradiens ellenőrzéséhez.

Köszönetemet fejezem ki dr. P. J. de Koningnak (Holland Tejipari Kutatóintézet, Ede, Hollandia), a vizsgálati minták rendelkezésre bocsátásáért, valamint az izoelektromos fókuszálással kapcsolatos hasznos útmutatásaiért.

IRODALOM

1. Sapolsky A. J., Woessner J. F.: J. Biol. Chem. 247, 2069 (1972).
2. Nakhleh, E. T., Abu Samra, S., Aweh, Z. L.: Anal. Biochem. 49, 218 (1972).
3. Conway—Jacobs, A., Lewin, L. M.: Anal. Biochem. 43, 394 (1971).
4. Radola, B. J.: Biochem. Biophys. Acta 295, 412 (1973).
5. Bours, J.: Science Tools, 20,2 (1973).
6. Bours, J.: J. Chromatog. 60, 225 (1971).
7. Beeley, J. A., Stevenson, S. M., Beeley, J. G.: Biochim. Biophys. Acta 285, 293 (1972).
8. de Koning, P. J., Draaisma, J. Th. M.: Neth. Milk Dairy J. 27, 363 (1973).

STUDIES ON THE DETERMINATION OF THE ISOELECTRIC POINTS OF PROTEINS SUITABLE AS INTERNAL STANDARDS

É. Pusztay

With the aim of extending the series of compounds proposed as internal standards, the isoelectric points of some proteins were determined by isoelectric focussing in thin-layer polyacrylamide gel. Correction of the pH-gradient can be carried out with the aid of the resulting isoelectric point values; in addition they can serve as comparison points in the determination of the unknown isoelectric points of proteins, in that the thin-layer technique permits simultaneous focussing of the internal standards and the proteins under examination.

UNTERSUCHUNGEN ZUR BESTIMMUNG DES ISOELEKTRISCHEN PUNKTS VON FÜR INNER STANDARDZWECKE GEEIGNETEN EIWEISSEN

É. Pusztay

Verfasserin hat zwecks Erweiterung der Reihe der als inner Standarde empfohlenen Verbindungen den isoelektrischen Punkt einiger Eiweisse mittels elektrischer Brennpunkteinstellung in Dünnschicht—Polyakrylat—Gel bestimmt. Mit Hilfe der so angegebenen isoelektrischen Punkt—Werte ist eine Korrektur der pH-Gradienten durchführbar; ausserdem können diese als Vergleichspunkt bei der Bestimmung des unbekannten isoelektrischen Punktes von Eiweissen dienen, indem die Dünnschichttechnik eine gleichzeitige Fokussierung der inneren Standarde und der zu testenden Eiweisse ermöglicht.

ИССЛЕДОВАНИЯ ПО ОПРЕДЕЛЕНИЮ ИЗОЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ ТОЧКИ БЕЛКОВ, ПРИМЕНИМЫХ В КАЧЕСТВЕ ВНУТРЕННЕГО СТАНДАРТА

Э. Пустай

Автор определял изоэлектрическую точку нескольких белков с помощью изоэлектронного фокусирования в тонком слое полиакриламида с целью расширения шкалы соединений, применяемых в качестве внутреннего стандарта. С помощью полученных показателей изоэлектрических точек можно проводить коррекцию pH , кроме того, они могут служить сравнительной (исходной) точкой при определении неизвестной изоэлектрической точки белков в силу того, что тонкослойная техника даёт возможность одновременного фокусирования внутренних стандартов и исследуемых белков.